JOSÉ ROBERTO PEREIRA GUEDES

**Ultradiluição homeopática de triiodotironina altera a apoptose celular
da cauda de girinos de *Rana catesbeiana*: in vitro**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências.

SÃO PAULO

2009

JOSÉ ROBERTO PEREIRA GUEDES

**Ultradiluição homeopática de triiodotironina altera a apoptose celular
da cauda de girinos de *Rana catesbeiana*: in vitro**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências.

Área de concentração: Patologia

Orientadora: Profa. Dra. Vera Luiza Capelozzi

SÃO PAULO

2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Guedes, José Roberto Pereira

Ultradiluição homeopática de triiodotironina altera a apoptose celular da cauda de girinos de *Rana catesbeiana* : in vitro / José Roberto Pereira Guedes. -- São Paulo, 2009.

Tese (doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Departamento de Patologia.

Área de concentração: Patologia.

Orientadora: Vera Luiza Capelozzi.

Descritores: 1.Ultradiluição 2.Homeopatia 3.Metamorfose biológica
4.Apoptose 5.Técnicas de cultura de tecidos 6.*Rana catesbeiana* 7.Girinos
8.Triiodotironina/administração & dosagem

USP/FM/SBD-472/09

Dê-me um fato e derrubarei todas as teorias que se contrapõem a ele. (Descartes)

As infinitas maravilhas do universo são a nós reveladas na medida exata em que nos tornamos capazes de recebê-las. A agudeza da nossa visão não depende do quanto podemos ver, mas do quanto sentimos. (Helen Keller)

Quanto mais observo o universo, mais ele se parece a um grande pensamento do que a uma grande máquina. (Albert Einstein)

Neste mundo, nada mais é mais maleável e frágil quanto a água. Contudo, ninguém, por mais poderoso que seja, resiste à sua ação (corrosão, desgaste, choque de ondas), ou pode viver sem ela. Não é bastante claro que a flexibilidade é mais eficaz que a rigidez? Poucos agem de acordo com essa convicção. (Lao Tse)

DEDICATÓRIA

Aos meus pais

Meu exemplo

Meu porto mais seguro

Meu incentivo

Francisca Retti Guedes
José Francisco Pereira Guedes

AGRADECIMENTOS

Minha Família e amigos: Clovis, Guilherme, Maria Cristina, Ricardo, Telma e Victor, aos quais muito amo pelo carinho, incentivo, cumplicidade e paciência.

À Dra. Vera Capelozzi pela amizade, capacidade e coragem de assumir a orientação de um tema tão polêmico.

Ao Dr. Paulo H. N. Saldiva por ser o primeiro a acreditar na minha linha de pesquisa e a abrir as portas para a sua concretização.

À FAPESP que subsidiou este trabalho, sem este apoio financeiro não conseguiríamos efetivar a sua execução (Auxílio à Pesquisa – FAPESP 2005/56551-9)

À Universidade de São Paulo (USP) e à Universidade Cidade de São Paulo (UNICID) por permitirem e fornecerem a infra-estrutura necessária para a realização deste sonho que foi a viabilização desta Tese.

À Solange Carrasco, a amiga, a incentivadora, a profissional competente, pela sua disponibilidade irrestrita, imprescindível para a realização deste estudo.

E finalmente à Deus por sempre me iluminar e me guiar...

RESUMO

GUEDES, J.R.P. **Ultradiluição homeopática de triiodotironina altera a apoptose celular da cauda de girinos de *Rana catesbeiana*: *in vitro*.** São Paulo, 2009. 60p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

Ultradiluição (UHD) é o efeito de uma solução, diluída acima do número de Avogadro, que na dependência da sua dinamização (diluição com sucussão) induz um efeito celular supressivo ou estimulante, com conseqüente obtenção de uma curva dose-efeito oscilatória. Por outro lado, a 3,3',5 Triiodo-L-Tironina (T3) é o hormônio mais importante na indução e manutenção das mudanças metamórficas dos girinos, nelas incluídas a absorção da cauda. O presente estudo, cego e randomizado, tem como objetivo comprovar que o T3 5.10^{-24} M (10^a cH) altera a apoptose induzida pelo T3 100 nM na cauda de girinos de *Rana catesbeiana*, *in vitro*. Foram distribuídos 60 explantes em três grupos: Grupo A: sem o estímulo do T3 em dose farmacológica e em UHD; Grupo B (teste): sob a ação de T3 100 nM e T3 10^a cH (5.10^{-24} M); Grupo C (controle): sob a ação do T3 100 nM e etanol 70% sem sucussão. A análise estatística da área dos explantes, no primeiro e ultimo dia do experimento, e do índice apoptótico foi realizado através do teste *t* Student e foi considerado estatisticamente significativo quando $p < 0,05$. Embora sem diferenças significativas na área dos explantes do grupo teste e no grupo controle, um maior e significativo índice apoptótico foi identificado nos explantes do grupo teste. Este resultado confirma que o T3 na 10^a cH altera a ação do T3 em dose farmacológica. Futuros experimentos serão realizados, com diferentes dinamizações, com o objetivo da parametrização da curva dose-efeito.

ABSTRACT

GUEDES, J.R.P. **Ultra high dilution of triiodothyronine modifies the cellular apoptosis of *Rana catesbeiana* tadpole tail: *in vitro*.**

São Paulo, 2009. 60p. Tese (Doutorado) – School of Medicine, University of São Paulo.

Ultra High Dilution (UHD) is the effect of a solution, beyond the Avogadro limits, that in the dependence of the applied dinamization (dilution with succussion) elicits a suppressive or a stimulant effect on a living cell, with a consequent generation of an oscillatory dose-effect curve. The entire process of anuran amphibian metamorphosis is under thyroid hormones control, included the complete resorption of the tadpole tail. A random and blind study was performed, with the intent to prove that T3 5.10^{-24} M (10^9 cH) modifies the apoptosis induction of T3 100 nM in *Rana catesbeiana* tadpoles' tail tips, *in vitro*. 60 Explants were distributed in three ways: Group A: without T3 action, at pharmacological and UHD dose; Group B (test): under the action of T3 100 nM and treated with T3 10^9 cH (UHD); Group C (control): under the action of T3 100 nM and treated with ethanol 70% unsuccussed. In order to identify significant differences in the area of the remainder explants, at the first and final day of the experiment, and in the apoptotic index we used a student t-test. Although we didn't find statistical difference in macroscopic tadpoles' tail tips area from test and control groups, a high and significant ($p < 0,05$) index of apoptosis in histology was found in explants of test group. This data confirms that T3 10^9 cH modifies the effect of T3 at pharmacological dose. More studies will be necessary, using different dinamizations, to the parameterization of the dose-effect curve proceeding from these experiments.

SUMÁRIO

I.	INTRODUÇÃO.....	13
	1. Homeopatia.....	14
	2. Hormesis.....	17
	3. Ultradiluição.....	17
	3.1 Efeitos da Dinamização.....	19
	4. Metamorfose.....	22
	5. Características Histoanatômicas da cauda de girinos dos anuros.....	24
	6. Morte Celular Programada.....	26
II.	PROPOSTA DO TRABALHO.....	28
III.	OBJETIVOS.....	30
	1. Gerais.....	31
	2. Específicos.....	31
IV.	MATERIAL E MÉTODOS.....	32
	1. Preparação das soluções	
	a. Preparação da solução NaOH 40 mM	33
	b. Preparação da solução Estoque de T3.....	33
	c. Preparação da solução controle e da ultradiluição de T3 ..	34
	2. Animais do experimento.....	35
	3. Cultura dos explantes.....	36
	4. Morfometria por Análise de Imagem Digital.....	38

5. Histologia.....	38
6. Detecção da Apoptose <i>in situ</i>	39
7. Grupos Experimentais.....	40
8. Análise Estatística.....	41
V. RESULTADOS.....	42
VI. DISCUSSÃO.....	51
VII. CONCLUSÃO.....	63
VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65

LISTA DE FIGURAS E DE TABELAS

Figura 1. Esquema anatômico da cauda de girinos de anuros. Department of Integrative Biology, University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada.	24
Figura 2: Caudectomia realizada na capela de fluxo laminar do Laboratório de Imunologia Celular do Departamento de Reumatologia da FMUSP.....	37
Figura 3: Caudectomia realizada na capela de fluxo laminar do Laboratório de Imunologia Celular do Departamento de Reumatologia da FMUSP.....	37
Figura 4: Histologia da cauda dos girinos do grupo A, cultivados por 96 horas sem a ação farmacológica e em UHD do T3, corados por hematoxilina & eosina (A,C,E) e <i>in situ</i> hibridização por TUNEL+apoptose (B,D,F).....	44
Figura 5: Histologia da cauda dos girinos do grupo B (teste) e do Grupo C (controle), cultivados por 96 horas sob a ação do T3 em dose farmacológica e em UHD, corados por hematoxilina & eosina (A,C,E) e <i>in situ</i> hibridização por TUNEL+apoptose (B,D,F).....	46
Figura 6: Exemplificação da redução da área de 3 explantes (nº 7, nº 22 e nº 30). Área inicial (A,C,E) e área final (B,D,F).....	49
Figura 7: Ilustração gráfica do índice apoptótico da cauda de girinos do grupo teste e controle, significância $p < 0.05$	50

Figura 8: Painel ilustrativo das caudas de girinos, cultivados por 10 dias, com células da musculatura estriada esquelética anucleadas, coradas por hematoxilina & eosina.....57

Tabela 1: Área (cm²) da cauda de girinos de *Rana catesbeiana* sob a ação de T3 100 nM, exposto à dois diferentes tratamentos: T3 10^a cH (teste) e solução controle.....47

I. INTRODUÇÃO

1. Homeopatia

A homeopatia é uma especialidade médica reconhecida desde 1980, integrando o corpo de especialistas do Conselho Federal de Medicina, Associação Médica Brasileira e Comissão Nacional de Residência Médica. Em 2008, o Conselho Regional de Medicina do Estado de São Paulo publicou o estudo “Especialidades Médicas no Estado de São Paulo” no qual, dentre as 53 especialidades médica reconhecidas, a homeopatia ocupa o 26º lugar. A facilidade de acesso às matérias-primas básicas, a possibilidade de multiplicação do medicamento pelas diluições, a segurança do medicamento, o baixo custo do tratamento associados à perspectiva humanística com que aborda de forma individualizada os doentes, aceitabilidade popular e viabilidade econômica fazem com que a homeopatia seja potencialmente uma terapêutica socialmente apropriada à realidade brasileira.

A homeopatia foi fundada por Samuel Hahnemann em 1790. Hahnemann utilizou o princípio da semelhança, isto é, considerava que medicamentos preparados a partir de substâncias capazes de causar determinados sintomas em um indivíduo sadio, poderiam curar estes mesmos sintomas, quando administrados em doses muito pequenas, em um indivíduo doente. Com o objetivo de diminuir a toxicidade que algumas destas substâncias apresentavam, Hahnemann começou a diluí-las e agitá-las vigorosamente, obtendo efeitos iguais ou superiores àqueles obtidos com doses maciças. Não é muito explicado pela história, mas possivelmente de

forma intuitiva, ao mesmo tempo em que ele diluía, passou também a agitar suas diluições. Este método, constituído por diluição e agitação (sucussão), foi sendo aperfeiçoado por Hahnemann durante o desenvolvimento de seu trabalho, e recebeu o nome de "dinamização", através do qual são produzidos os medicamentos homeopáticos (TEIXEIRA, 1998).

Outro aspecto importante a ser notado nos princípios estabelecidos por Hahnemann, para melhor utilizar o fenômeno homeopático, foi o da experimentação das substâncias a serem utilizadas como medicamentos. Ele administrou substâncias em indivíduos saudáveis, em pequenas quantidades, diariamente, até que estes manifestassem uma série de sinais e sintomas causados por aquela substância. Estes sinais, obtidos da administração de cada substância, foram listados desde a época de Hahnemann em compêndios denominados *Matérias Médicas*. Até a sua morte, Hahnemann realizou a experimentação de 99 substâncias, trabalho continuado por seus seguidores até nossos dias (LUZ, 1996; CEZAR, 1999).

As ultradiluições homeopáticas facilmente ultrapassam o número de Avogrado e, portanto torna-se estatisticamente improvável encontrar uma única molécula do insumo ativo ou do soluto na solução. Desta forma o medicamento é constituído exclusivamente do insumo inerte ou solvente, utilizado na dinamização, impregnado com informações do soluto. Com base nas leis da física e nas atualmente conhecidas propriedades da água, a grande maioria da comunidade científica não aceita a possibilidade de que o

solvente possa "lembrar" do soluto que uma vez foi nele diluído, mesmo obedecidas as normas de diluição Hahnemannianas¹.

A homeopatia entende que todos os distúrbios da saúde são causados pelo desequilíbrio da energia interna; em outras palavras, enquanto a nossa energia vital está harmonizada, todo o nosso organismo funciona perfeitamente e estamos saudáveis; caso contrário surgem as sensações desagradáveis e as manifestações físicas a que chamamos de doença. O tratamento homeopático é uma forma alternativa de tratar estas anormalidades do organismo, utilizando-se da energia retirada de diversas substâncias encontradas nos vegetais, animais e também nos minerais, e isto é conseguido através de um processo de preparação realizado por um farmacêutico especializado que produz os medicamentos homeopáticos, pobres em substância (isto é, com pouco ou nenhum soluto) e ricos em determinados tipos de energia.

Portanto a doutrina homeopática apresenta duas principais linhas de pesquisa baseada nos seus dois pilares principais: i. o tratamento pela similitude e ii. o efeito das ultradiluições. O presente trabalho dedica-se ao estudo da segunda linha de pesquisa, isto é, o estudo do efeito das ultradiluições.

¹ O número de Avogrado ($6,02 \times 10^{23}$) indica o número de moléculas contidas em um mol ou uma molécula-grama de substância. Em decorrência deste número, teorias da química clássica afirmam que as diluições homeopáticas além do limite de 10^{-24} se constituíam apenas do solvente e, portanto não poderiam exercer nenhum efeito sobre o organismo.

2. Hormesis

O termo hormesis foi proposto em 1943 por Southman e Erhlich (apud Calabrese and Baldwin, 2000), quando observaram que estrato químico de cedro em baixas concentrações estimulava o crescimento de fungos enquanto em altas concentrações o inibia. Entretanto em 1888 este fenômeno já havia sido caracterizado como lei de Arndt-Schulz. Hugh Schultz publicou vários experimentos defendendo a tese de que a resposta a um estímulo sobre a célula viva é inversamente proporcional à intensidade ou quantidade do mesmo. Ao mesmo tempo, Rudolf Arndt desenvolveu uma “Lei Básica da Biologia”, em que um estímulo leve aceleraria a atividade vital, um estímulo de médio a forte elevaria a atividade vital, um estímulo forte a suprimiria e um estímulo muito forte cessaria por completo essa mesma atividade vital. Em 1888, Arndt e Schultz demonstraram o efeito estimulante sobre o crescimento das leveduras quando agentes tóxicos (cloreto de mercúrio, ácido arsênico, ácido crômico, ácido salicílico e ácido fórmico) eram administrados em doses muito baixas às culturas. (Halm, 1993; Oberbaum and Cambar, 1994 *apud* Bastide e Lagache (1998).

Trata-se de um modelo estritamente molecular pelo fato de as concentrações utilizadas estarem abaixo do número do Avogrado.

3. Ultradiluição

Ultradiluição (UHD) é o efeito de uma solução, diluída acima do número de Avogrado, que na dependência da sua dinamização (diluição com

sucussão) pode induzir um efeito celular supressivo ou estimulante, com conseqüente obtenção de uma curva dose-efeito oscilatória. Provavelmente, uma das características mais enigmáticas das ultradiluições é a não linearidade dos seus efeitos. Em muitos estudos, utilizando modelos *in vivo* e *ex vivo*, especialmente os dedicados à iso-endopatia (ultradiluições elaboradas com substâncias endógenas ou análogas utilizadas com o objetivo de modular/alterar os processos biológicos relacionados às suas funções fisiológicas originais. Corresponde ao princípio da identidade e não ao da semelhança) , obtém-se uma curva dose-efeito oscilatória. (Bonamin, 2008).

O presente experimento não se fundamenta, necessariamente, no raciocínio mecanicista da ciência clássica de uma reação direta Hormônio–Receptor Nuclear Hormonal. É inquestionável que uma molécula pode desempenhar um papel deflagrador e/ou modulador sobre um sistema, dependendo do contexto e da presença ou não de outros fatores concomitantes. No caso das ultradiluições: i. os efeitos parecem ser exclusivamente moduladores; ii. tanto o princípio da identidade como o da semelhança estão inseridos em um contexto não molecular e sim informacional (Bonamin, 2008).

3.1. Efeitos da Dinamização

Existem algumas teorias que tentam explicar este armazenamento de informações por parte do solvente, mesmo em diluições acima do número do Avogrado, por exemplo:

- a. A teoria dos significados corporais – Os seres vivos podem ser entendidos como um sistema complexo, sendo que sua propriedade, exclusiva e característica, pode ser revelada sob a ação das ultradiluições. Nesta proposta, Agnes Lagache e Madeleine Bastide, postulam que a comunicação dos seres vivos com o meio ambiente ocorre por interações moleculares e não moleculares. Os seres vivos não são somente sistemas abertos, mas também sistemas sensitivos. Para que esta informação, não molecular, exerça um efeito na organização geral do sistema, ela tem que fazer sentido, isto é, ser significativa para o organismo receptor. Nas ultradiluições o insumo ativo, utilizado na preparação dos medicamentos homeopáticos seria a informação matricial (função geradora) e a água ou o solvente utilizado seria o carreador da informação. Para que esta informação seja significativa para o receptor ela precisa corresponder ao princípio da identidade ou o da semelhança. (LAGACHE, 1997; Bonamin, 2008).
- b. Medicamento homeopático atuando como fonte de informações que, alterando o potencial de informação do organismo, modifica a

trajetória de evolução do pensamento e das idéias (KHRENNIKOV, 2000).

- c. Diferenças na proporção de átomos isotopicamente diferentes assim como a formação de clusters e clatratos definidas no solvente pelo insumo ativo (SCHULTE, 1999).
- d. Desenvolvimento de oscilações de fase coerentes através do acoplamento de radiações do dipolo da água (ENDLER *et al.*, 1997).
- e. Estruturas I.e. (Ice formed under electric field) - É sabido que moléculas de água formam estruturas cristalinas e estáveis (gelo) à temperatura ambiente e sob alta pressão ($>7\text{kB}$). Geralmente uma pressão tão alta não ocorre normalmente na terra. Entretanto, é evidenciado que uma pressão desta grandeza pode existir entre um íon e uma molécula de água imediatamente vizinha a este, devido à atração eletrostática entre a carga do íon e o momento de dipolo elétrico da molécula de água (LO, 1996a). Inicialmente as estruturas I.e. são formadas ao redor dos íons, do insumo ativo, presentes na solução. Devido ao processo da dinamização (diluição e sucussão), estas estruturas, esféricas e simétricas, se partem em vários fragmentos menores. Estes fragmentos têm um momento de dipolo elétrico que atrai moléculas de água vizinhas, formando fragmentos maiores, portanto estas estruturas I.e. existem independente dos íons originais, por exemplo quando ultrapassamos o número do Avogrado (LO, 1996a).

LO (1996b) empregou inúmeros métodos, como a determinação da constante dielétrica, medição da força eletromotriz, resistividade, espectro de fluorescência e estabilidade térmica, encontrando diferenças significativas entre a água com estruturas l.e. e a água pura, normal. SAMAL e GECKELER (2001) realizaram estudos subseqüentes do fenômeno da agregação cluster-cluster em solução aquosa, devido a ação de conjugados de fullerenos-ciclodextrina, β -ciclodextrina, cloridrato de sódio, monofosfato sódico de guanosina e oligonucleotídeo de DNA, confirmando a existência de agregados com dimensões maiores em soluções aquosas mais diluídas que em soluções mais concentradas.

- f. nanoestruturas poliméricas - Luc Montagnier, virologista e médico francês, descobriu, junto com sua equipe no Instituto Pasteur, o retrovírus da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida em 1986, sendo galardoado com o Nobel de Fisiologia/Medicina de 2008.

Em 6 de Janeiro de 2009 Montagnier *et al.* (2009) publicaram um estudo, em que observaram que o processo de filtração do sobrenadante de linfócitos humanos infectados com *Mycoplasma pirum*, um microorganismo com 300 nM de diâmetro, através de filtros com diâmetro de poros de 100 nM ou 20 nM, deixavam o fluido “aparentemente” estéril. Entretanto quando este fluido “estéril” era incubado com cultura de linfócitos humanos negativos para

Mycoplasma por 2 a 3 semanas, os Mycoplasmas originais eram regenerados.

Investigando a natureza desta forma de filtrado, descobriu-se outra propriedade que poderia ou não estar relacionada com o respectivo agente causador: a capacidade de produzir ondas eletromagnéticas de baixa frequência reproduzida pela técnica homeopática de diluição (decimais) e sucussão (dinamização) do filtrado “estéril” em água.

Estas ondas eletromagnéticas estão associadas com a presença de nanoestruturas poliméricas de tamanho definido na diluição aquosa. Em média o sinal decorrente das ondas eletromagnéticas era obtido em diluições entre 10^{-9} a 10^{-18} . Segundo resultados, obtidos com posteriores experimentos, concluiu-se que o DNA do respectivo microorganismo era a fonte dos sinais eletromagnéticos. Porém a natureza física da nanoestrutura responsável pela emissão da onda eletromagnética ainda não está determinada.

Serão estas ondas eletromagnéticas oriundas de específicas seqüências de DNA capazes de carrear informações genéticas?

4. Metamorfose

Embora a metamorfose ontogênica ocorra em muitos grupos de animais, ela é melhor conhecida nos insetos e nos anfíbios. Metamorfose pode ser definida como uma série de abruptas mudanças pós-embrionárias

envolvendo transformações estruturais, fisiológicas, bioquímicas e comportamentais.

Normalmente três períodos metamórficos são utilizados como referência pelos biólogos: (1) pré-metamorfose, caracterizado por um considerável crescimento e desenvolvimento de estruturas larvais não englobando mudanças metamórficas (2) pró-metamorfose, um período de contínuo crescimento, especialmente dos membros, e uma iniciação das mudanças metamórficas; e (3) clímax, o período das mudanças mais radicais que culminam com a perda da maioria das características larvais; nos anuros este período começa pelo início da absorção da cauda e termina com a completa regressão desta (DUELLMAN E TRUEB, 1986).

Durante os estágios da metamorfose, ocorre uma perfeita integração entre as glândulas endócrinas acarretando mudanças morfológicas e fisiológicas. GUNDERNATSCH (1911) apud TATA (1999) descobriu que girinos de *Rana temporaria* alimentados com glândula tireoidiana de cavalos tinham sua metamorfose acelerada. Esta observação marca o início da ciência da endocrinologia experimental e o começo dos estudos do controle endócrino da metamorfose dos anfíbios.

A metamorfose dos anfíbios é regulada principalmente por três espécies de hormônios: hormônios tireoidianos (HT), córtico-adrenais e prolactina. Os principais hormônios da tireóide são: tetraiodotironina (T4, tiroxina) e triiodotironina (T3). Devido à comprovada ação de seus hormônios na metamorfose de animais experimentais, a tireóide é considerada a

glândula mais importante na metamorfose dos anfíbios, tanto assim que girinos precocemente tireoidectomizados continuam a crescer sem adquirirem o fenótipo de adultos. A administração de T3 ou T4 em qualquer estágio, após a tireoidectomia, induz a metamorfose desses animais (TATA, 1999; ROT-NIKCEVIC e WASSERSUG, 2003).

5. Características Histoanatômicas da cauda de girinos dos anuros.

A figura 1, abaixo, representa anatomicamente a cauda dos girinos de anuros.

Figura 1. Esquema anatômico da cauda de girinos de anuros
Department of Integrative Biology, University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada
<http://www.uoguelph.ca/zoology/devobio/34mmfrog/db34fg36.htm>
Nadadeira dorsal (Dorsal fin), Medula espinhal (Spinal Cord), Notocorda (Notochord),
Pró-vertebras (somite) e Nadadeira ventral (Ventral fin)

Na *Rana catesbeiana*, as nadadeiras, dorsal e ventral, nada mais são que pele envolvendo tecido conectivo por ambos os lados, não apresentando suporte ósseo (DOHERTY *et al.*, 1998).

A musculatura esquelética é o maior componente da cauda de girinos de anuros sendo organizada circundando a notocorda. As fibras musculares mais periféricas são de contração lenta enquanto que as mais centrais são de contração rápida (ELINSON *et al.*, 1999).

A ação da notocorda como um centro de sinalização é um componente largamente reconhecido no desenvolvimento embrionário normal, entretanto sua ação estrutural é igualmente importante, pois ela é a primeira estrutura de sustentação de um cordado. A superfície da notocorda da *Rana catesbeiana* é relativamente lisa e composta por células muito próximas com um pequeno volume de material extracelular; não contendo sangue ou vasos linfáticos, nervos ou fibrilas extracelulares. Devido ao grande vacúolo que ocupa a maior porção das células da notocorda, o citoplasma é limitado à região perinuclear.

A notocorda é envolvida por camadas distintas como: a membrana basal, túnica notocordal, elástica interna e externa e a túnica externa de tecido conectivo. A membrana basal envolve completamente a notocorda, mas a distribuição e organização das outras camadas variam de acordo com posição ao longo do comprimento da cauda (BRUNS e GROSS, 1970; MALIKOVA *et al.*, 2007).

A extremidade caudal da notocorda apresenta uma estreita relação com o tubo neural á qual se apóia dorsalmente.

6. Morte Celular Programada

Conforme comentado anteriormente, enquanto o girino cresce em tamanho ele sintetiza doses cada vez maiores de HT, induzindo a uma sucessão de mudanças morfológicas e fisiológicas nos tecidos e órgãos destes animais. Um componente importante da maioria destas alterações é o remodelamento induzido por estes hormônios. Neste remodelamento o programa genético mais simples, por não ocorrer um crescimento ou diferenciação concomitante, somente morte e reabsorção celular, é a morte celular programada que ocorre na cauda destes girinos.

Os HT exercem seus efeitos pela sua interação com receptores nucleares que se ligam ao DNA, atuando como fatores de transcrição, como consequência a reabsorção da cauda de girinos tem sido estudada como resultado da ativação ou repressão direta de sítios de genes (BROWN *et al.*, 1996; WANG e BROWN, 1993).

A morte celular através apoptose exerce uma função fundamental na manutenção da homeostase celular em processos patológicos e evolutivos. O termo morte celular programada tem uma definição funcional melhor que apoptose, pois implica que a morte celular é uma resultante da ativação de programas preexistentes que estão codificados no genoma (SAIKUMAR *et al.*, 1999). Um dos exemplos mais característicos, sem dúvida, é a apoptose

que ocorre durante a metamorfose tireóide dependente dos anfíbios. Postula-se que os efeitos do T3 estejam envolvidos na regulação de genes críticos deste processo evolutivo. Esta indução da morte celular pelo T3 tem uma morfologia apoptótica típica, como exemplo, pode-se citar a fragmentação característica, tipo escada, do DNA nuclear, observada também durante a apoptose das células dos mamíferos (SU *et al.*, 1997).

A apoptose, em anfíbios no estágio de metamorfose tireóide dependente, nos apresenta uma excelente oportunidade de estudo da influência dos HT sobre a cascata de eventos moleculares que levam à indução da expressão de várias categorias de genes, por exemplo, aqueles que controlam a apoptose celular da cauda destes animais. A reabsorção da cauda dos girinos envolve uma completa remoção de todos os tipos de células em um curto período de tempo, o que oferece um excelente modelo para estudar a morte celular.

Partes da cauda de girinos, assim com a cauda inteira, intestinos e outros órgãos, podem ser mantidos em cultura de tecidos e exibirão mudanças relativas à reabsorção, em resposta direta à adição dos hormônios tireoidianos, em níveis fisiológicos, ao meio de cultura (DERBY, 1968; DERBY e ETKIN, 1968; ISHIZUYA-OKA e SHIMOZAWA, 1991 e 1992; RAY e DENT, 1986; SHINTANI *et al.*, 2002; SU *et al.*, 1997; TATA *et al.*, 1991).

II. PROPOSTA DO TRABALHO

A nossa proposta, enquanto pesquisador é executar um experimento com uma boa qualidade científica, isto é, adotando um critério metodológico rigoroso, com o objetivo de corroborar com os resultados obtidos em outros trabalhos relacionados ao estudo das Ultradiluições.

ENDLER *et al.* (1994) (1995) (1997) adotaram um modelo utilizando anfíbios de *Rana temporaria* para estudar a sensibilidade desses animais a tiroxina (T4) em altas diluições manipuladas de acordo com as técnicas homeopáticas durante a metamorfose. Baseando-se nesses artigos, executamos trabalho intitulado “Homeopathically prepared dilution of *Rana catesbeiana* thyroid glands modifies its rate of metamorphosis” (Guedes *et al.*, 2004).

Assim, continuando nesta mesma linha de pesquisa, elaborou-se o presente trabalho.

III. OBJETIVOS

1. Objetivos Gerais

- Demonstrar laboratorialmente a ação do 3,3',5 Triiodo-L-Tironina (T3) em Ultradiluição (UHD) na cultura de caudas de girinos de *Rana catesbeiana*.

2. Objetivos Específicos

- Caracterizar morfometricamente a ação do T3, em UHD, nos explantes cultivados através da área da cauda.
- Caracterizar quantitativamente o índice da apoptose celular nos explantes cultivados e correlacioná-los com a área da cauda.

IV. MATERIAL E MÉTODO

1. Preparação das soluções

a. Preparação da Solução NaOH 40 mM.

N° de Moles = Massa NaOH (g) / Peso Molecular

$$N^{\circ} \text{ de Moles} = 0,32 / 40 = 0,008 = 8 \cdot 10^{-3}$$

Molaridade = N° de Moles (NaOH) / N° de Litros da Solução

$$\text{Molaridade} = 8 \cdot 10^{-3} / 0,2 \text{ L} = 40 \cdot 10^{-3}$$

Portanto para obter-se uma solução $40 \cdot 10^{-3}$ M de NaOH diluiu-se 0,32g de NaOH em 200mL de Água Destilada.

b. Preparação da Solução Estoque de T3 em NaOH 40mM

N° de Moles = Massa T3 (g) / Peso Molecular

$$N^{\circ} \text{ de Moles} = 0.034 \text{ g} / 673 = 0,00005 = 5 \cdot 10^{-5}$$

Molaridade = N° de Moles (T3) / N° de Litros da Solução

$$\text{Molaridade} = 5 \cdot 10^{-5} / 0.1 \text{ L} = 5 \cdot 10^{-4}$$

Portanto preparou-se a solução estoque, diluindo-se 0,034g de 3,3',5 Triiodo-L-Tironina (Sigma T 6397) em 100mL de NaOH 40mM, obtendo-se uma Molaridade de $5 \cdot 10^{-4}$. A solução estoque foi conservada no freezer à Temperatura de 0°C e envolvida em papel alumínio.

Para a utilização do T3, quando da adição aos explantes, diluí-se 0,5 mL da solução estoque em 50 mL do meio L15, obtendo-se uma concentração $5 \cdot 10^{-6}$ M de T3.

Armazenou-se as alíquotas de 5 mL de hormônio ($5 \cdot 10^{-6} \text{M}$), utilizadas por aplicação, em tubos de ensaio envolvidos em papel alumínio e conservados no Freezer.

Na adição de 1 mL de T3 $5 \cdot 10^{-6} \text{M}$ em 50 mL de Meio de cultura se obtém a concentração de $100 \cdot 10^{-9} \text{M}$ ou 100 nM de T3.

c. Preparação da solução Controle e da Ultradiluição de T3

- i. A solução controle será etanol 70%
- ii. Segundo a Farmacopéia Homeopática Brasileira (1997), para obter-se a diluição Centesimal Hahnemanniana, dispõe-se sobre uma mesa uma fileira de frascos identificados em número correspondente ao grau da potência que se quer obter, como no presente estudo manipulou-se a Triiodotironina na 10^a cH (**C**entesimal **H**ahnemanniana) utilizou-se 10 frascos.

Preparação da 1cH, 2cH e 3cH.

- Insumo Inerte: NaOH 40 mM
- Insumo Ativo: T3 $5 \cdot 10^{-4} \text{M}$ em NaOH 40 mM

Técnica:

Dissolve-se 0,1 mL de T3 $5 \cdot 10^{-4} \text{M}$ em NaOH 40 mM em 10 mL de solução NaOH 40 mM na proporção 1:100. Aplica-se 100 sucussões manuais (100 movimentos de choque do vidro que contém a solução contra

uma superfície macia), obtendo-se então T3 5.10^{-6} M ou T3 na 1cH,

Dissolve-se 0,1 mL do T3 1cH em 10 mL de solução NaOH 40 mM, aplica-se 100 sucussões, obtendo-se o T3 na 2cH.

Dissolve-se 0,1 mL do T3 2cH em 10 mL de solução NaOH 40 mM, aplica-se 100 sucussões, obtendo-se o T3 na 3cH.

Preparação da 4cH até 10cH:

- Insumo Inerte: etanol 70%
- Insumo Ativo: 3cH (T3 5.10^{-10} M), 4cH (T3 5.10^{-12} M), 5cH (T3 5.10^{-14} M), 6cH (T3 5.10^{-16} M), 7cH (T3 5.10^{-18} M), 8cH (T3 5.10^{-20} M), 9cH (T3 5.10^{-22} M), 10cH (T3 5.10^{-24} M).

Dissolve-se 0,1 mL da solução da potência anterior em 10 mL de etanol 70%. Aplica-se 100 sucussões manuais em cada etapa de diluição, até atingir-se a 10cH ou T3 5.10^{-24} M. As diluições foram manipuladas em frascos de plástico pois o T3 tem uma alta aderência ao vidro. As diluições 9cH e 10cH foram armazenadas à temperatura ambiente envoltas em papel alumínio, para evitar-se a ação da claridade.

2. Animais do experimento

O experimento foi realizado com girinos de *Rana catesbeiana* que se encontravam no estágio 39 a 41 de Gosner (GOSNER 1960), isto é, no início do clímax da metamorfose, obtidos no Ranário Experimental e de Produção

do Instituto de Pesca de São Paulo. Quando transportados para o Laboratório de Imunologia Celular do Departamento de Reumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade São Paulo (FMUSP) eram mantidos em solução de água desclorada com permanganato de potássio $2,37 \cdot 10^{-6}M$, 4000 UI/mL de penicilina G sódica e 4000 µg/mL de sulfato de estreptomicina durante as 12 horas anteriores à caudectomia. Os animais foram tratados de acordo com os princípios éticos do Comitê de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

3. Cultura dos explantes

Os girinos ficaram imersos em gelo por o redor de 15 minutos, para a obtenção do efeito anestésico desejado, posteriormente desinfetou-se a área da cauda com 10.000 UI/mL de Penicilina, 10.000 mg/mL de Estreptomicina e 25 µg/mL of anfotericina B, imediatamente antes de serem submetidos à caudectomia na capela de fluxo laminar do Laboratório de Imunologia Celular do Departamento de Reumatologia da FMUSP. Devido o tamanho dos animais utilizados e para padronizar o experimento realizou-se a caudectomia o mais próximo do final da cauda, isto é, cada explante ficou com ao redor de 2 cm, conforme ilustram as figuras 2 e 3 a seguir.

Figura 2: Caudectomia realizada na capela de fluxo laminar do Laboratório de Imunologia Celular do Departamento de Reumatologia da FMUSP.

Figura 3: Caudectomia realizada na capela de fluxo laminar do Laboratório de Imunologia Celular do Departamento de Reumatologia da FMUSP

Os explantes foram imersos seqüencialmente em frascos individuais com soluções estéreis de: i) solução tampão fosfato salino (PBS), ii) álcool a 70%, iii) PBS e iv) PBS e em seguida foram distribuídos aleatoriamente em frascos de cultura de células 75cm² (Costar – USA), devidamente numerados, contendo 50mL de Meio Leibovitz L-15 60% com glutamina (L-15 Medium (Leibovitz) with glutamin - Sigma L4386), 10% de solução contendo penicilina, estreptomicina e anfotericina (Antibiotic Antimicotic Solution 100 mL - Sigma A5955).

4. Morfometria por Análise de Imagem Digital

As imagens digitais das caudas, no primeiro e ultimo dia do experimento, foram armazenadas em Adobe Photoshop, e a área e o comprimento das caudas foram mensuradas em ImageJ Launcher software[®] and UTHSCSA Image Tool[®].

5. Histologia

Os explantes remanescentes foram armazenados em cassetes e fixados em Solução BODIAN (1937) por 6 horas a temperatura ambiente. Posteriormente foram enviados para o Departamento de Patologia da FMUSP onde foram desidratados com uma série de concentrações crescentes de etanol, embebidos em parafina e seccionados em cortes seriais transversais de 4µm de espessura.

6. Detecção da apoptose *in situ*

A utilização de métodos confiáveis e reprodutíveis para identificar e quantificar a apoptose é uma condição preponderante para a diferenciação do comportamento apoptótico nos grupos utilizados, portanto no presente experimento, a fragmentação do DNA associado com a apoptose foi detectada através da utilização do método Terminal deoxinucleotidil transferase Uracil biotin Nick End Labeling (TUNEL) (GAVRIELI *et al.* 1992; WIJSMAN *et al.* 1993).

Resumidamente, os cortes histológicos foram desparafinizados em xilol e reidratados em uma escala decrescente de etanol até água destilada. As lâminas foram lavadas por 4 vezes com água bidestilada durante 2 minutos e então imersas em deoxinucleotidil transferase terminal (TdT) (Boehringer Mannheim), quando adicionou-se a deoxiuridina trifosfatada marcada com fluoresceína sobre as lâminas, que se aderiu aos fragmentos terminais do DNA através a ação catalítica da deoxinucleotidil transferase (que catalisa o alongamento do DNA sem "instrução" de um "primer"). Nos controles negativos, a TdT é eliminada da solução. As lâminas foram incubadas com um anticorpo específico para fluoresceína conjugada com peroxidase. A reação foi interrompida lavando-se duas vezes as lâminas em PBS.

A incorporação do marcador no DNA se faz especificamente nos pontos em que a molécula foi cortada pela ação da endonuclease, e, portanto, a marcação é tanto mais intensa quanto maior o grau de degradação internucleossomal.

Nos explantes o índice apoptótico é determinado através a contagem dos núcleos positivamente corados, portanto apoptóticos, que coincidem com os pontos de um retículo com 100 pontos e 50 linhas (WEIBEL, 1990). São examinados 10 campos aleatórios e não coincidentes, ao aumento de 400X, totalizando 1000 pontos por lâmina. Portanto o índice apoptótico é conceituado como o número de núcleos corados pela coloração Túnel em 1000 células contadas.

7. Grupos Experimentais

No experimento foram utilizados 60 girinos de *Rana catesbeiana*, tratados e caudectomizados de acordo com as especificações já citadas, e distribuídos aleatória e individualmente em frascos de cultura de células, contendo meio Leibovitz's L-15 com 10% de solução antibiótica e antimicótica.

Solicitou-se a identificação, por uma pessoa externa ao experimento, de Frascos A e B das soluções T3 10cH (Solução Ativa) e etanol 70% (Controle).

- **Grupo A:** O experimento com este grupo, constituído por 20 explantes sem o estímulo do T3 em dose farmacológica e em UHD, já havia sido realizado pela sua inserção em projetos piloto executados anteriormente.

Fotografaram-se os 40 explantes, sendo posteriormente divididos nos seguintes grupos:

- **Grupo Teste (B):** Adição de 1 mL de T3 $5 \cdot 10^{-6}$ M em 50 mL de Meio de cultura, obtendo-se a concentração de T3 $100 \cdot 10^{-9}$ M ou 100 nM, e a adição de 3 Gotas ($3 \times 0.03 \text{ mL} = 0,15 \text{ mL}$ ou 150 μL) da Solução T3 10cH.
- **Grupo Controle (C):** Adição de 1 mL de T3 $5 \cdot 10^{-6}$ M em 50 mL de Meio de cultura e a adição de 3 Gotas ($3 \times 0.03 \text{ mL} = 0,15 \text{ mL}$ ou 150 μL) da Solução Controle.

A troca do meio de cultura, com a adição das soluções pertinentes a cada grupo foi realizado cada 48 horas, como o experimento teve a duração de 96 horas realizamos somente uma troca.

Os 39 explantes remanescentes foram fotografados, armazenados em cassetes, fixados em Solução Bodian e enviados para o Departamento de Patologia da FMUSP.

8. Análise Estatística

A análise da variância morfométrica e imunohistoquímica dos explantes, nos diferentes grupos, foram detectados pelo teste *t* de Student. O nível de significância estatística foi estabelecido em 5% ($p < 0,05$). Todos os dados foram analisados por meio do programa estatístico SPSS para Windows (versão 10,0; Chicago, Illinois).

V. RESULTADOS

As características histológicas dos explantes do grupo A, sem ação do T3 em dose farmacológica e em UHD, cultivados por 96 horas e corados por hematoxilina & eosina (A, C, E) e em hibridização *in situ* técnica do TUNEL para detecção da apoptose (B, D, F) estão evidenciadas na Figura 4. Nesta figura constata-se uma histoarquitetura normal com a preservação da nadadeira dorsal e ventral (A, B), núcleos intactos na epiderme (E), músculo esquelético (C, E) e na cartilagem (C). Identifica-se apoptose fisiológica em núcleos de células da epiderme e do músculo esquelético (D, F).

Figura 4: Histologia da cauda dos girinos do grupo A, cultivados por 96 horas sem a ação farmacológica e em UHD do T3, corados por hematoxilina & eosina (A,C,E) e *in situ* hibridização por TUNEL+apoptose (B,D,F). Nadadeira dorsal (ND), nadadeira ventral (NV), musculatura estriada esquelética (ME), notocorda (N), epitélio (EP) e cartilagem (CA)

As características histológicas dos explantes dos grupos teste (B) e controle (C), ambos sob a ação de 100 nM de T3, cultivados por 96 horas e corados por hematoxilina & eosina (A, C, E) e em hibridização *in situ* técnica do TUNEL para detecção da apoptose (B, D, F), não apresentaram diferenças significativas constatadas na Figura 5. Nesta figura observa-se uma distorção da histoarquitetura muito semelhante nos dois grupos (A, B), numerosos núcleos apoptóticos na epiderme (B), músculo esquelético (D, F), na notocorda (F) e em grande aumento a involução da musculatura estriada esquelética (C).

Figura 5: Histologia da cauda dos girinos do grupo B (teste) e do Grupo C (controle), cultivados por 96 horas sob a ação do T3 em dose farmacológica e em UHD, corados por hematoxilina & eosina (A,C,E) e *in situ* hibridização por TUNEL+apoptose (B,D,F). Musculatura estriada esquelética (ME), epitélio (EP) e núcleos apoptóticos (NA)

A área, em cm^2 , e o índice apoptótico dos explantes remanescentes dos grupos teste e controle podem ser apreciados na tabela 1.

Tabela 1: Área (cm^2) da cauda de girinos de *Rana catesbeiana* sob a ação de T3 100nM, exposto à dois diferentes tratamentos: T3 10^3 cH (teste) e solução controle

Área Inicial (cm^2)		Área Final (cm^2)		Redução (cm^2)		Índice Apoptótico Nº X / 1000 pontos	
teste	controle	teste	controle	teste	controle	teste	controle
0.93	0.74	0.08	0.08	0.85	0.66	15	10
1.07	0.69	0.23	0.07	0.84	0.62	18	0
0.64	0.73	0.12	0.13	0.52	0.60	20	8
0.94	0.82	0.22	0.08	0.72	0.74	25	0
1.57	1.03	0.20	0.17	1.37	0.86	19	12
0.98	0.86	0.22	0.12	0.76	0.74	0	13
1.00	0.89	0.30	0.36	0.70	0.53	5	15
1.36	0.91	0.22	0.16	1.14	0.75	12	18
-	0.96	-	0.12	-	0.84	-	7
1.08	0.71	0.18	0.11	0.90	0.60	11	0
0.96	1.09	0.11	0.23	0.85	0.86	10	20
1.27	1.27	0.25	0.19	1.02	1.08	0	10
1.16	1.32	0.35	0.78	0.81	0.54	13	2
1.08	1.21	0.14	0.40	0.94	0.81	0	10
1.04	1.03	0.22	0.28	0.82	0.75	19	5
1.09	1.26	0.17	0.18	0.92	1.08	14	5
1.08	0.90	0.19	0.14	0.89	0.76	29	3
1.11	1.41	0.23	0.58	0.88	0.83	5	5
1.22	0.95	0.17	0.17	1.05	0.78	5	8
1.12	1.25	0.50	0.39	0.62	0.86	3	6
$\bar{M}$ 1.09	$\bar{M}$ 1.00	$\bar{M}$ 0.22	$\bar{M}$ 0.24	$\bar{M}$ 0.87	$\bar{M}$ 0.76	$\bar{M}$ 11.7	$\bar{M}$ 7.9

Depois de transcorridas 96 horas de cultura do grupo A, a média da área inicial e final dos explantes (1.05 vs. 0.98cm^2) assim como o índice apoptótico não apresentaram diferenças estatisticamente significativas e, portanto não foram incluídas na tabela 1. Contudo, a média da área inicial e

final dos explantes dos grupos teste e controle foram respectivamente 1.09 vs. 0.22 cm² e 1.00 vs. 0.24cm², conforme pode ser exemplificado na figura 6, com uma média de redução da área de 0.87cm² e 0.76cm², porém sem significância estatística ($p>0.05$). Entretanto, o índice apoptótico foi significativamente maior no grupo teste quando comparado ao grupo controle 11.7 vs. 7.9 ($p<0.05$), figura 7.

Figura 6: Exemplificação da redução da área de 3 explantes (nº 7, nº 22 e nº 30). Área inicial (A,C,E) e área final (B,D,F). A média de redução da área, dos explantes dos grupos teste e controle foram 0.87cm^2 e 0.76cm^2 respectivamente, porém sem significância estatística ($p>0.05$)

Figura 7: Ilustração gráfica do índice apoptótico da cauda de girinos do grupo teste e controle, significância $p < 0.05$

VI. DISCUSSÃO

No presente experimento, estabeleceu-se um protocolo experimental para a cultura da cauda de girinos de *Rana catesbeiana in vitro* com o objetivo de demonstrar-se a ação do T3 em UHD. Os explantes foram distribuídos aleatoriamente em três grupos, a saber: Grupo A: sem o estímulo do T3 tanto em dose farmacológica como em UHD; Grupo B (teste): sob a ação de 100 nM de T3 e tratado com T3 10cH (UHD); Grupo C (controle): sob a ação de 100 nM de T3 e tratado com etanol 70% sem sucussão.

Neste estudo demonstrou-se que, após 96 horas de cultura tecidual, os explantes do grupo A não apresentaram um efeito apoptótico significativo. Entretanto as caudas de girinos dos grupos teste e controle perderam uma considerável porção da sua área, sendo mais significativa no grupo teste. Os explantes, dos grupos teste e controle, perderam uma média de 78% de sua área, sendo 80% vs.76% respectivamente (Tabela 1 e Figura 6). Embora não se constatou uma diferença estatística significativa na redução da área dos explantes dos referidos grupos, um índice apoptótico significativamente maior foi observado no grupo teste ($p < 0,05$). Os resultados obtidos confirmam que o T3 na 10ª cH (UHD) modificam a ação do T3 100 nM.

Em estudos anteriores, adotando-se um modelo experimental muito semelhante ao descrito previamente, trabalhou-se com caudas de girinos, sob a ação de T3 1000 nM. Nestes explantes remanescentes, dos grupos teste e controle, identificou-se uma redução média de 74,4% da sua área total, sendo 76,3% vs.72,5% respectivamente. A redução da área dos

explantes do grupo teste também foi maior, porém sem significância estatística.

Nestes dois estudos, sob a ação do T3 100 nM e 1000 nM, a área de redução dos explantes do grupo teste foi maior quando comparada à do grupo controle, mas sem atingir-se significância estatística, provavelmente porque o método de mensuração macroscópica, utilizado para a constatação da morte celular programada induzida pelo T3 em UHD, é menos sensível que a do índice apoptótico.

Nossos resultados corroboram com os obtidos por outros pesquisadores (DERBY, 1968; SMITH AND TATA, 1976; JI *et al.* 2007) que previamente demonstraram a ação dos hormônios tireoidianos, em doses farmacológicas, na redução da área de explantes de caudas de girinos *in vitro*, assim como que esta reabsorção tecidual é mediada através ativação das vias apoptóticas (JI *et al.* 2007).

Para a estruturação de um protocolo de pesquisa adequado, foram realizados 15 projetos piloto, o primeiro em maio de 2004 e o último em Abril de 2009. Nestes 15 projetos concluímos que:

- a. Entre o dimetilsulfóxido (DMSO) e o NaOH 40 mM, o veículo mais indicado, no presente protocolo de pesquisa, para transportar a 3,3',5 Triiodo-L-Tironina (T3) para o interior celular é o NaOH 40 mM. Tanto pela comprovada toxicidade celular do DMSO como pela indicação obtida por i) Sigma productInformation

(http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/General_Information/1/f3388inf.Par.0001.File.tmp/f3388inf.pdf) e ii) contato pessoal com a Profa.

Dra. Cecília Helena Azevedo Gouveia Ferreira, do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, com reconhecida experiência na investigação dos efeitos do hormônio tireoidiano, principalmente no desenvolvimento e metabolismo ósseo.

- b. Necessidade do estabelecimento de um protocolo de assepsia criterioso relacionado á assepsia da cauda dos girinos e na utilização da capela de fluxo laminar.
- c. Realizou-se a troca dos meios de cultura diariamente, porém evidenciou-se a viabilização dos explantes por até 15 dias com a troca dos meios de cultura cada 48 horas, o que vem corroborar com o protocolo experimental adotado por TATA (1966 e 1991).
- d. Imprescindibilidade na utilização de vidraria siliconizada ou de plástico, pois o hormônio tireoidiano tem uma alta aderência ao vidro.
- e. Imprescindibilidade na utilização de animais sadios e no mesmo estágio de metamorfose.
- f. A utilização de álcool iodado 1% para a assepsia da cauda dos girinos precedente à caudectomia é contra-indicada. Como os Girinos, após a caudectomia, eram alocados em água desclorada para que sobrevivessem, observou-se que quando adotávamos tal assepsia observava-se perda da área da cauda que sofria a ação da solução de iodo, isto é, a cauda literalmente “caia”.

g. Adequação da área dos explantes: após a realização de vários projetos piloto conseguíamos a manutenção dos explantes no meio de cultura, entretanto quando ao exame histológico identificávamos que as células musculares estavam totalmente desprovidas de núcleos, conforme pode ser constatado na figura 8. Ao entrar em contato com o Prof. Tata (autor de trabalhos que serviram de modelo para o nosso trabalho) fomos orientados que a cauda de *Rana catesbeiana* é muito grossa, o que dificultaria a difusão de oxigênio e nutrientes, levando à autólise da cauda. “*Dear Roberto Guedes, Thank you for consulting me about your problem with organ culture of Rana catesbeiana tadpole tails. I find that, because of their large size and volume and the consequent problem of insufficient diffusion of nutrients and oxygen, Rana catesbeiana tadpole tails are difficult to maintain in organ culture. I am therefore not surprised that you noticed apoptotic nuclei in muscle tissue. For this reason, in particular the advantage of knowing the "age" and smaller size, almost all our studies were performed on Xenopus laevis tadpole tails in culture. I know that there used to be a problem of obtaining Xenopus in Brazil, but I believe that at the Medical School in Rio there is a colony of Xenopus. I am curious to know how long the Rana catesbeiana tadpole tail shown in your picture had been kept in culture. A good test would be to see if the number of apoptotic nuclei in muscle (and other tissues) increases at 48-96 hours after the addition of about 5*

nanomolar triiodothyronine. I am sorry that I am unable to help you more, but please do not hesitate to consult me further about your work. Wishing you good luck. Jamshed Tata (Dr. Jamshed R. Tata, National Institute for Medical Research, Mill Hill, London NW7 2HA U.K., Tel:(direct line) +44-(0)20-8816 2108 (switchboard) +44-(0)20-8959 3666 fax: +44-(0)20-8906 4477, Email: jtata@nimr.mrc.ac.uk.)"

Para solucionarmos este problema optou-se pela utilização de explantes com ao redor de 2 cm de comprimento.

Figura 8: Paineil ilustrativo das caudas de girinos, cultivados por 10 dias, com células da musculatura estriada esquelética anucleadas, coradas por hematoxilina & eosina. Musculatura estriada esquelética (ME) e notocorda (N).

h. **Viabilização da ação do T3 ponderal** - Com o procedimento acima, isto é, com os explantes ao redor de 2 cm de comprimento, conseguiu-se a viabilização dos tecidos que compõe a cauda dos girinos por até 15 dias, porém não observava-se uma redução significativa da área das caudas induzida pelo T3 em dose farmacológica. Em fevereiro de 2009, no penúltimo projeto piloto, utilizou-se a estufa sem CO₂, pois na bula do meio Leibovitz consta *“o meio L-15 [Leibovitz] foi originalmente formulado com o objetivo de ser utilizado em sistemas sem dióxido de carbono [CO₂] que necessitavam de bicarbonato de sódio. O L-15 é tamponado através do seu complemento de sais, aminoácidos de base livre e galactose em substituição da glucose para ajudar a manter o controle fisiológico do pH.”*. Com esta conduta viabilizou-se a indução pelo T3 1000 nM, da perda, em média, de 74% da área inicial dos explantes em 96 horas de experimentação. O CO₂ acidifica o meio de cultura e o T3 não é viável em pH ácido somente em pH fisiológico.

A apoptose é regulada pela ação de um consistente número de genes ativados pelo acoplamento de ligantes específicos aos receptores da morte, no caso do T3, estes receptores são nucleares e compostos por duas isoformas principais: Receptor do hormônio tireoidiano α (TR α) e β (TR β). Estes executores da morte, de modo geral, são responsáveis pela proteólise que ocorre durante a apoptose, cujos alvos são os fatores envolvidos na

reparação, na fragmentação e na duplicação do DNA, no splicing do RNA, na manutenção da integridade do citoesqueleto e na divisão celular (HOFMAN 1999). Segundo Bonamin (BONAMIN, 2008) as UHD exercem um efeito exclusivamente modulador, e não deflagrador, de uma cascata de efeitos concomitantes. Nosso futuro estudo será detectar, através do presente protocolo experimental, quais as alterações induzidas pelo T3 em UHD nos diferentes caminhos apoptóticos acionados pelo T3 em dose farmacológica, isto é, estudar-se-á através análise imunohistoquímica, a expressão de Fas (CD95), caspase-8, P53, Bax etc., nos explantes remanescentes.

Na literatura científica não são encontrados muitos artigos relacionados à apoptose induzida pelo Fas em células de vertebrados não mamíferos, uma das exceções é o experimento realizado por MANGURIAN *et al.*, 1998, no qual observou que esta molécula, em esplenócitos de *Xenopus laevis*, apresenta uma homologia funcional e estrutural com a Fas humana, indicando uma conservação evolucionária, dentre os vertebrados, no que diz respeito ao início da apoptose.

Existem muitas causas para a injúria e morte celular, entre elas, hipóxia e desequilíbrio nutricional, caracterizado neste trabalho pela identificação histológica de explantes com células musculares desprovidas de núcleos, isto é, em autólise (Figura 8). A matriz extracelular (ME) e, particularmente a membrana basal (MB), provêem o substrato onde as células se aderem, migram e proliferam, além de influenciar diretamente a

forma e função celular. A MB circunda as fibras musculares estriadas esqueléticas, sendo críticas para a sua estrutura e função. Nos últimos anos houve um grande progresso na identificação e caracterização de dois complexos de proteínas do sarcolema que conectam o citoesqueleto da fibra muscular à MB na musculatura esquelética: as integrinas e o complexo distrofina-glicoproteínas. A adesão celular, mediada pelas integrinas, regula a apoptose em uma variedade de células, nelas incluídas a da musculatura esquelética (LIU *et al.* 2008).

No nosso experimento observou-se que as células musculares esqueléticas dos explantes remanescentes, coradas por hematoxilina & eosina e em hibridização *in situ* técnica do TUNEL para detecção da apoptose, estavam desprovidas de núcleos, o oposto ao encontrado nas células da epiderme e da notocorda. Portanto, esta observação reafirma as conclusões de SACHS *et al.* (1997): 1) As primeiras células a responder à apoptose na cauda de girinos, são as da musculatura esquelética por serem perenes, isto é, células que quase não se multiplicam ou se multiplicam de modo insignificante, provavelmente devido à destruição da MB. Uma das ações do T3 é o remodelamento da ME, induzindo alterações no contato célula/célula ou célula/ME, com uma conseqüente ativação do programa apoptótico, este contato é um fator de sobrevivência envolvendo a sinalização pelas integrinas; e 2) Para a indução da apoptose na musculatura esquelética *in vitro*, as células da epiderme devem, necessariamente, estar presentes.

Neste estágio de discussão, poderemos nos questionar sobre a possibilidade da extrapolação dos resultados obtidos, neste estudo, para os mamíferos, particularmente para os seres humanos. A importância dos hormônios tireoidianos na promoção do crescimento, no desenvolvimento e no metabolismo nos mamíferos pode ser analisada experimentalmente logo após o nascimento e na vida adulta com algum grau de precisão, porém o estudo de sua ação na fase pós-embriônica e no desenvolvimento fetal torna-se dificultoso devido sua transferência placentária e na múltipla inter-relação entre a tireóide, outros hormônios e fatores do crescimento durante o desenvolvimento intra-uterino.

Tornou-se então necessário examinar a ação dos hormônios tireoidianos em organismos cuja fertilização ocorre externamente e os embriões são de vida livre. Importante observar que a ação celular dos hormônios tireoidianos foi conservada na evolução, dos anfíbios aos humanos, embora seu transporte pela membrana celular e sua interação com as proteínas citoplasmáticas determinem a dinâmica de sua distribuição dentro da célula alvo, é o mecanismo envolvendo a sua ligação com receptores nucleares específicos o passo crucial para o início da progressão molecular e bioquímica que conduz à resposta fisiológica a estes hormônios (Tata 1999). Os receptores nucleares são compostos por duas isoformas principais: TR α e TR β , que atuam como repressores e ativadores transcricionais na ausência e na presença do ligante (primariamente o T3), respectivamente. Portanto, baseados nestas informações, pode-se transferir

as conclusões obtidas neste estudo para os seres humanos, isto é, o T3 que alterou a apoptose nas células de anfíbios pode também alterar a apoptose nas células dos mamíferos, incluindo-se as humanas.

VII. CONCLUSÃO

Neste estudo, desenvolveu-se um protocolo experimental com o objetivo de demonstrar-se a ação do T3 em UHD modificando a apoptose de girinos de *Rana catesbeiana in vitro*. Neste modelo o T3 5.10^{-24} M (10ª cH), adicionado ao meio de cultura contendo os explantes sob a ação de T3 100 nM, induziu um aumento significativo ($p<0,05$) no índice apoptótico. Portanto, nossos resultados vêm a corroborar com as conclusões obtidas pela comunidade científica que se dedica ao estudo da ação das UHD. Experimentos utilizando diferentes doses, principalmente as doses mais diluídas, e análises imunohistoquímicas dos indutores da apoptose nos explantes remanescentes serão necessários.

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BASTIDE,M.& LAGACHE,A. Is similia principle related to the Arndt-Shutz law and hormesis? In: **53rd CONGRESS OF THE INTERNATIONAL HOMEOPATHIC MEDICAL LEAGUE**, Amsterdam, p.25-29, 1998.

Disponível <http://www.entretiens-internationaux.mc/similia.htm> Acesso 10/Nov/2009.

BODIAN,D. The staining of paraffin sections of nervous tissues with activated Protargol. The role of fixatives. **The Anatomical Record**, 69, p.153-162, 1937.

BONAMIN,L.V.; LAGACHE,A. & BASTIDE,M. Research on ultra-dilutions and the Theory of Corporeal Signifiers: the follow up. In: Bonamin LV (Ed). **Signals and Images: Contributions and contradictions of high dilution research**. Dordrecht, Springer, p.9-43, 2008

BROWN,D.D.; WANG,Z.; FURLOW,J.D.; KANAMORI.A.; SCHWARTZMAN.R; REMO,B.F. & PINDER,A. The thyroid hormone-induced tail resorption program during *Xenopus laevis* metamorphosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.93, p.1924-1929, 1996.

BRUNS,R.R. & GROSS,J. Studies on the tadpole tail I. Structure and organization of the notochord and its covering layers in *Rana catesbeiana*. **American Journal of Anatomy**, 128, p.193-224, 1970.

- CALABRESE,E.J.; BALDWIN,L.A. Tales of two similar hypotheses: the rise and fall of chemical and radiation hormesis. ***Human & Experimental Toxicology***, v.19, p.85-97, 2000.
- CEZAR,A.T. ***O medicamento homeopático nos serviços de saúde***. São Paulo, 1999. 162p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Saúde Pública, Universidade São Paulo.
- DERBY,A. & ETKIN,W. Thyroxine induced tail resorption in vitro as effected by anterior pituitary hormones. ***Journal of Experimental Zoology***, v.169, p.1-8, 1968.
- DERBY,A. An in vitro quantitative analysis of the response of tadpole tissue to thyroxine. ***Journal of Experimental Zoology***, v.168, p.147-156, 1968.
- DOHERTY,P.A.; WASSERSUG,R.J. & LEE,J.M. Mechanical properties of the tadpole tail fin. ***The Journal of Experimental Biology***, 201, p.2691–2699, 1998.
- DUELLMAN,W.E. & TRUEB,L. Metamorphosis. In: The Johns Hopkins University Press, ed. ***Biology of amphibians***, Baltimore – Maryland 1986. p.173-178.
- ELINSON,R.P.; REMO,B. & BROWN,D.D. Novel structural elements identified during tail resorption in *Xenopus laevis* metamorphosis: Lessons from tailed frogs. ***Development Biology***, 215, p.243-252, 1999.
- ENDLER,P.C.; PONGRATZ,W.; KASTBERGER,G.; WIEGANT,F.A.C.; & SCHULTE,J. The effect of highly diluted agitated thyroxine on the

climbing activity of frogs. ***Veterinary and Human Toxicology***, 36 (1), p.56-59, 1994.

ENDLER,P.C.; PONGRATZ,W.; SMITH,C.W. & SCHULTE,J. Non molecular information transfer from thyroxin to frogs with regard to homeopathic toxicology. ***Veterinary and Human Toxicology***, 37 (3), p.259-260, 1995.

ENDLER,P.C.; PONGRATZ,W.; SMITH,C.W.; SCHULTE,J.; SENEKOWITSCH,F. & CITRO,M. Non molecular information transfer from thyroxin to frogs; by means of homeopathic preparation and electronic processing. In M Bastide (ed.). ***Signals and Images***. Dordrecht: Kluwer, p.149-159, 1997.

FARMACOPÉIA HOMEOPÁTICA BRASILEIRA. 2.ed. São Paulo: Andrei, 1997.

GAVRIELI,Y.; SHERMAN,Y. & BEM-SASSON S.A. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. ***The Journal of Cell Biology***, 119 (3), p.493–501, 1992.

GOSNER,K.L. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. ***Herpetologica***, 16, p.1831-1890, 1960.

GUEDES,J.R.P.; FERREIRA,C.M.; GUIMARÃES,H.M.B.; SALDIVA,P.H.N. & CAPELOZZI,V.L. Homeopathically prepared dilution of *Rana catesbeiana* thyroid glands modifies its rate of metamorphosis. ***Homeopathy***, 93, p.132-137, 2004.

HOFMANN,K. The modular nature of the apoptotic signaling proteins. ***Cellular and Molecular Life Sciences***, 55, p.1113-1118, 1999.

- ISHIZUYA-OKA,A. & SHIMOZAWA,A. Induction of metamorphosis by thyroid hormone in anuran small intestine culture organotypically in vitro. ***In Vitro Cellular and Development Biology-Animal***, 27A, p.853-857, 1991.
- ISHIZUYA-OKA,A. & SHIMOZAWA,A. Programmed cell death and heterolysis of larval epithelial cells by macrophage-like cells in anuran small intestine in vivo and in vitro. ***Journal of Morphology***, 213, p.185-196, 1992.
- JI,L.; DOMANSKI,D.; SKIRROW,R.C. & HELBING,C.C. Genistein Prevents Thyroid Hormone-Dependent Tail Regression of *Rana catesbeiana* Tadpoles by Targetting Protein Kinase C and Thyroid Hormone Receptor α . ***Developmental Dynamics***, 236, p.777-790, 2007
- KHRENNIKOV,A. Classical and quantum dynamics on p-adic trees of ideas. ***BioSystems***, v.56, p.104-105, 2000.
- LAGACHE,A. What is information? From matter towards meaning. In M Bastide (ed.). ***Signals and Images***. Dordrecht: Kluwer, p.279-291, 1997.
- LIU,J.; BURKIN,D.J. & KAUFMAN,S.J. Increasing $\alpha_7\beta_1$ -integrin promotes muscle cell proliferation, adhesion, and resistance to apoptosis without changing gene expression. ***American Journal of Physiology – Cell Physiology***, 294 (2), p.627–640, 2008.
- LO,S.Y. Anomalous state of ice. ***Modern Physics Letters B***, 10 (19), p.909-919, 1996a.

LO,S.Y.; LO,A.; CHONG,L.W.; TIANZHANG,L.; HUA,L.H.; GENG,X. Physical properties of water with I.e. structures. **Modern Physics Letters B**, 10 (19), p.921-930, 1996b.

LUZ,M.T. **A arte de curar versus a ciência das doenças: história social da homeopatia no Brasil**. São Paulo: Dynamis, 1996. 342p.

MALIKOVA,M.A.; STRY,M.V.; SYMES,K. Apoptosis regulates notochord development in *Xenopus*. **Development Biology**, 311, p.424-448, 2007

MANGURIAN,C.; JOHNSON,R.O.; MCMAHAN,R.; CLOTHIER,R.H. & RUBEN,L.N. Expression of a Fas-like proapoptotic molecule on the lymphocytes of *Xenopus laevis*. **Immunology Letters**, 64 (1), p.31-38, 1998.

MONTAGNIER,I.; AÏSSA,J.; FERRIS,S.; MONTAGNIER,J.L. & LAVALLÉE,C. Electromagnetic signals are produced by aqueous nanostructures derived from bacterial DNA sequences. **Interdisciplinary Sciences: Computational Life Sciences**, 1, p.81-90, 2009.

RAY,L.B.; DENT,J.N. Observations on the interaction of prolactin and thyroxine in the tail of the bullfrog tadpole. **General and Comparative Endocrinology**, 64, p.36-43, 1986.

ROT-NIKCEVIC,I.; WASSERSUG,R.J. Tissue sensitivity to thyroid hormone in athyroid *Xenopus laevis* larvae [Original Articles]. **Blackwell Science Ltd.**, 45 (4), p.321-325, 2003.

- SACHS,L.M.; ABDALLAH,B.; HASSAN,A.; LEVI,G.; LUZE,A., REED,J.C. & DEMENEIX,B.A. Apoptosis in *Xenopus* tadpole tail muscles involves Baxdependent pathways. **The FASEB Journal**, 11, p.801-808, 1997
- SAIKUMAR,P.; DONG,Z.; MIKHAILOV,V.; DENTON,M.; WEINBERG,J. & VENKATACHALAM,M. Apoptosis: Definition, Mechanisms, and Relevance to Disease [Physiology In Medicine]. **The American Journal of Medicine**, 107 95), p.489-506, 1999.
- SAMAL,S. & GECKELER,K.E. Unexpected solute aggregation in water on dilution. **Chemical Communications**, p.2224-2225, 2001.
- SCHULTE,J. Effects of potentization in aqueous solutions. **British Homeopathic Journal**, 88, p.155-160, 1999.
- SHINTANI,N.; NOHIRA,T.; HIKOSAKA,A. & KAWAHARA,A. Tissue-specific regulation of type III iodothyronine 5-deiodinase gene expression mediates the effects of prolactin and growth hormone in *Xenopus* metamorphosis [Original Articles]. **Blackwell Science Ltd.**, 44 (4), p.327-335, 2002.
- SMITH,K.B. & TATA,J.R. Are new proteins synthesized during hormone-induced tadpole tail regression? **Experimental Cell Research**, 100, p.129-146, 1976.
- SU,Y.; SHI,Y.; STOLOW,M.A. & SHI,Y.B. Thyroid Hormone Induces Apoptosis in Primary Cell Cultures of Tadpole Intestine: Cell Type Specificity and Effects of Extracellular Matrix [Regular Articles]. **The Rockefeller University Press**, 139 (6), p.1533-1543, 1997.

- TATA,J.R. Amphibian metamorphosis as a model for studying the developmental actions of thyroid hormone. **Biochimie**, 81, p.359-366, 1999.
- TATA,J.R. Requirement for RNA and protein synthesis for induced regression of the tadpole tail in organ culture. **Developmental Biology**, 13, p.77-94, 1966.
- TATA,J.R.; KAWAHARA,A. & BAKER,B.S. Prolactin inhibits both thyroid hormone-induced morphogenesis and cell death in cultured amphibian larval tissues. **Developmental Biology**, 146, p.72-80, 1991.
- TEIXEIRA,M.Z. **Semelhante cura semelhante: o princípio de cura homeopático fundamentado pela nacionalidade médica e científica**. São Paulo: Editorial Petrus, 1998, 463p.
- WANG,Z.; BROWN, D.D. Thyroid hormone-induced gene expression program for amphibian tail resorption. **The Journal of Biological Chemistry**, 268 (22), p.16270-16278, 1993.
- WEIBEL,E.R. Morphometry: stereological theory and practical methods. In: Gil J (Ed). **Models of Lung Disease-Microscopy and Structural Methods**. New York, Marcel Dekker, p.199-247, 1990
- WIJSMAN,J.H.: JONKER,R.R. & KEIJZER,R. A new method to detect apoptosis in paraffin sections: in situ end labeling of fragmented DNA. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, 41(1), p.7-12, 1993